

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELIZABETH VENIALGO HOTZ DA SILVA

CULTIVO DE MICROALGAS *Scenedesmus subspicatus* COM EFLUENTE
AVÍCOLA COMO MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO

PALOTINA
2018

ELIZABETH VENIALGO HOTZ DA SILVA

CULTIVO DE MICROALGAS *Scenedesmus* sp. COM EFLUENTE AVÍCOLA
COMO MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO

Relatório de estágio obrigatório apresentado ao
Curso de Tecnologia em Biotecnologia da
Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina
como requisito à obtenção do título de
Tecnólogo em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Souza
Gomes

PALOTINA
2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIZABETH VENIALGO HOTZ DA SILVA

CULTIVO DE MICROALGAS *Scenedesmus* sp. COM EFLUENTE AVÍCOLA
COMO MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para aprovação na disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório do Curso Superior de Tecnologia Em Biotecnologia para a seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Luis Fernando Souza Gomes
Orientador - Departamento de Engenharia e Exatas. Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.



Prof.ª Dr.ª Raquel Stroher
Departamento de Engenharia e Exatas. Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.



Prof. Dr. Pedro Gusmão Borges Neto
Departamento de Engenharia e Exatas. Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

Palotina, 06 de julho de 2018

Dedico este trabalho aos meus fiéis companheiros, Gilberto meu esposo, e meus filhos Ana Júlia e Josué, tesouros dos quais Deus me agraciou, esta vitória é nossa.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ter me abençoado com este trabalho de pesquisa e conclusão de curso, pela força, consolo e sustento que me acompanharam durante toda a minha vida.

À Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, por proporcionar a oportunidade e o privilégio de fazer parte de sua história. Ao curso de Tecnologia em Biotecnologia, aos professores, sem os quais nada disso seria possível. Professores que me deram toda a base e o conhecimento para sair da universidade com todas as ferramentas necessárias para atuar de forma ética e profissional, agradeço pela dedicação e confiança investida nos estudantes, pois através deste, conheci pessoas maravilhosas e descobri virtudes que ainda não conhecia, obrigada por me permitirem crescer e evoluir.

À minha família, mãe, irmãos, em especial a Leticia, companheira de curso, obrigada pelas conversas, desabafos, risos e choros, enfim, obrigada pelo apoio e compreensão.

De modo muito especial, minha imensa gratidão ao meu esposo Gilberto e aos meus filhos, Ana Júlia e Josué, grandes parceiros e fiéis companheiros nos momentos de alegria e de dificuldade, pela compreensão e pelo tempo dedicado aos cuidados com nossa família.

Agradeço o meu professor Orientador Dr. Luis Fernando Souza Gomes, pela oportunidade de trabalhar com as microalgas.

A Franciele pela dedicação e auxílio incondicional no laboratório.

Às minhas amigas, amigos, colegas de curso, de projetos e eventos vividos durante esta jornada, em especial a Gabriela, Gisele e Sabrina, agradeço por sempre representarem a tradução da palavra colaboração e amizade durante essa graduação!

Ao corpo docente da UFPR, Direção Geral e Servidores pela oportunidade e colaboração nos momentos necessários.

A todos que, porventura, esqueci, expresso a minha eterna gratidão!

*“Jamais se desespere em meio às mais sombrias aflições de sua vida,
pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda”.*

Provérbio chinês

RESUMO

A produção de biomassa algácea para aplicações biotecnológicas é uma alternativa promissora, a utilização de efluentes de tratamento de águas residuárias é uma estratégia para a redução do custo de produção através do aproveitamento de nutrientes disponíveis nestes efluentes. Neste trabalho foi cultivada a microalga *Scenedesmus subspicatus* em efluente de abatedouro avícola como meio alternativo, sendo os cultivos conduzidos em 2 concentrações diferentes, mais o meio M.C. Ao total foram 5 tratamentos realizados em 4 réplicas, tratamento 100% S.A (efluente sem diluição, sem autoclavar), 50% S.A (efluente diluído em 50%, sem autoclavar), 100% A (efluente sem diluição, autoclavado), 50% A (efluente diluído em 50%, autoclavado) e o meio de cultivo M.C. Os ensaios realizados demonstraram resultados superiores comparados ao meio padrão (meio M.C). Nas condições deste trabalho o efluente de abatedouro avícola se mostrou um meio alternativo potencial na produção de biomassa, podendo ser utilizado tanto puro ou em diluições de 50% sem que sua produtividade apresente rendimentos diferentes, estatisticamente, nos parâmetros utilizados por este trabalho (nível de significância 0,05). Para a velocidade específica de crescimento, os tratamentos 50%A e 100% S.A foram melhores que 50%S.A e 100% A, e, todos foram superiores ao meio MC. O melhor tratamento para obtenção de biomassa algal foi o 50% A, com rendimento de 0,965 g L⁻¹, no sétimo dia de cultivo.

Palavras-Chave: *Scenedesmus* sp, biomassa, efluente avícola.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 MICROALGAS..... | 11 |
| 2.1.1 <i>Scenedesmus sp.</i> | 12 |
| 2.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL..... | 12 |
| 2.2.1 TEMPERATURA..... | 21 |
| 2.2.2 pH | 21 |
| 2.2.3 NUTRIENTES | 22 |
| 2.2.4 LUZ | 22 |
| 2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS | 23 |
| 2.3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS..... | 24 |
| 2.3.2 APLICAÇÃO FARMACÊUTICA E COSMÉTICOS | 26 |
| 2.3.3 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS | 27 |
| 2.3.4 APLICAÇÃO NA AQUICULTURA | 27 |
| 2.3.5 APLICAÇÃO ALIMENTÍCIA | 28 |
| 2.3.6 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM MICROALGAS | 28 |
| 2.4 EFLUENTE DE ABATEDOURO AVÍCOLA | 29 |
| 2.4.1 PROCESSOS DE TRATAMENTO | 30 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO | 31 |
| 3.2 CEPA UTILIZADA <i>SCENEDESMUS SUBSPICATUS</i> | 31 |
| 3.3 LOCAL DE CULTIVO | 31 |
| 3.4 MEIO ALTERNATIVO | 32 |
| 3.4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE | 32 |
| 3.5 MEIOS DE CULTIVO..... | 32 |
| 3.5.1 Meio de Cultivo Padrão | 32 |
| 3.6 PREPARO DO CULTIVO | 33 |
| 3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR..... | 33 |
| 3.8 CULTIVO INICIAL..... | 34 |
| 3.9 CULTIVO DEFINITIVO | 34 |
| 3.11 PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA | 35 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 36 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEIO ALTERNATIVO | 36 |
| 4.2 CRESCIMENTO CELULAR..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3 VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO | 37 |
| 4.4 PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA | 40 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 42 |
| 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 42 |
| REFERÊNCIAS | 43 |

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos e serviços tem impulsionado a atividade industrial, elevando a utilização dos recursos naturais e gerando cada vez mais resíduos, dentre os recursos naturais mais afetados pela industrialização os recursos hídricos ganham destaque, devido sua vasta aplicação nos processos e aos impactos que sofrem pelas altas gerações de efluentes. A utilização de água pela indústria pode ocorrer diretamente nas etapas do processo ou incorporadas aos produtos. Exceto pelos volumes adicionados aos produtos, as águas tornam-se contaminadas por resíduos do processo industrial, gerando os efluentes líquidos.

As indústrias demonstram grande preocupação quanto aos tratamentos utilizados para cada tipo de efluente, constantemente buscam melhorias e a otimização dos mesmos, a fim de que cada método utilizado seja o mais adequado para o resíduo tratado, evitando que seu despejo cause alterações no meio ambiente ou gere problemas legais e sociais. Outro fato que têm impulsionado os processos de tratamentos são as legislações ambientais, que obrigam as indústrias a seguirem parâmetros que garantem a eficiência do tratamento aplicado.

O setor do agronegócio é um dos que mais crescem no país, e dentro dele temos as indústrias de abate de aves, que se destacam por estarem em plena expansão. Estas apresentam um elevado consumo de água e consequentemente produzem grandes volumes de efluente líquido com elevada carga orgânica, assim, seu resíduo possui um elevado poder poluente (GIORDANO, 2004). Frente a esta crescente geração de efluentes, é necessário dar prioridade aos sistemas de tratamento, a fim de promover a constante otimização dos mesmos, possibilitando assim seu pleno funcionamento e potencialização de sua capacidade de remediação (DAMASCENO et al., 2009).

Segundo Lucyk et al. (2015), os abatedouros de aves consomem em média 25 a 50 litros de água por ave abatida, principalmente na etapa de resfriamento das carcaças. Dentre os padrões de lançamento de efluentes fixados pela Portaria nº 031 de 2008 do Instituto Ambiental do Paraná (IAP), os parâmetros que requerem maior atenção para as indústrias de abate de aves

são: a carga orgânica, o pH, materiais sedimentáveis, óleos e graxas, nitrogênio total e o fósforo total, destes parâmetros os mais difíceis de serem atingidos pelos processos de tratamentos são a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), nitrogênio e fósforo, devido concentração de carga proteica e lipídica do efluente.

Atualmente existem vários processos utilizados para o tratamento do efluente avícola, os quais variam de acordo com as características do mesmo. Em geral as agroindústrias utilizam processos tradicionais que combinam o tratamento físico-químico ao tratamento biológico. Os sistemas de tratamento mais empregados para remoção de nitrogênio baseiam-se nos processos biológicos de nitrificação e desnitrificação, pela ação de micro-organismos quimioossintetizantes que convertem aerobicamente a amônia a nitrito e a nitrato (nitrificação) e posterior redução do nitrato a nitrogênio em condições anóxicas (desnitrificação). A remoção de fósforo do efluente pode ser realizada através de processos biológicos e físico-químicos. Dentre os processos físico-químicos estão a eletrodialise, a osmose reversa e a precipitação química, sendo este último o processo mais utilizado (NUNES, 2004).

Os processos biológicos tornaram-se uma alternativa interessante no combate a poluição e na geração de novos produtos, uma vez que esses processos utilizam do metabolismo microbiano para degradar e remover poluentes, bem como para transformar matérias primas gerando produtos menos nocivos ao meio ambiente. Nesses processos, existem uma gama de micro-organismos atuantes, como bactérias, fungos e algas. Destes, algas de diversas espécies têm tido destaque (SCHMITZ et al., 2012).

As microalgas em geral utilizam o dióxido de carbono, a luz, nitrogênio e fósforo como fontes de nutrição, que são biologicamente convertidos em matéria orgânica através da fotossíntese, e essa matéria pode ser transformada em produtos de alto valor agregado.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo utilizar a água residuária de abatedouro avícola como meio alternativo para o cultivo da microalga *Scenedesmus subspicatus*, bem como determinar as velocidades específicas de crescimento e sua produtividade de biomassa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1 MICROALGAS

Bicudo e Menezes (2006), relatam que o termo alga foi proposto oficialmente por Lineu em 1753, no plural *Algae* nomeia uma das 4 ordens de criptógamos e inclui 14 gêneros e 214 espécies, dos quais apenas 5 gêneros e 48 espécies constituem o que hoje entendemos por algas. Os mesmos autores definem algas como os talófitos (plantas sem a presença de raízes, caules e folhas) e protistas clorofilados, alguns inclusive seus parentes não pigmentados, cujos órgãos de reprodução jamais são envoltos por um tecido constituído de células estéreis.

As microalgas são reconhecidas como uma das formas mais antigas de vida do planeta. Constituem uma ampla gama de organismos autotróficos que crescem pela fotossíntese semelhantemente as plantas terrestres, sendo consideradas responsáveis por grande parte da produção de oxigênio presente na biosfera. Sua estrutura unicelular lhes permite facilmente converter a energia solar em energia química. O crescimento das microalgas se dá a um ritmo acelerado podendo dobrar sua biomassa em menos de um dia (VENDRUSCOLO, 2009).

Sabe-se que estão presentes em praticamente todos os ecossistemas existentes na terra, pois representam uma grande variedade de espécies vivas em diferentes condições ambientais. A quantidade de espécies existentes não é conhecida exatamente são encontrados relatos da existência de 200.000 até alguns milhões de representantes. Essa grande diversidade caracteriza as microalgas como fonte ilimitada de produtos biotecnológicos.

A classificação taxonômica das algas é bastante extensa, pois exibem uma enorme diversidade de espécies, com representantes de formas unicelulares que possuem desde micro a milímetros de diâmetro, células em colônia, filamentos até folhas e talos com diferenciações complexas (BICUDO et al., 2006).

2.1.1 *Scenedesmus* sp.

Os autores Bicudo e Menezes (2006), apresentam 11 divisões e trinta classes de algas, entre as divisões encontra-se a Chlorophyta, a *Scenedesmus subspicatus*, pertence a esta divisão, classe Chlorophyceae; família Cnedsraceae; Gênero Scenedesmus. Muito comum no plâncton de águas doces e menos frequente em águas salobras, são clorofiladas, unicelulares e uninucleadas, indivíduos coloniais que vivem flutuando na água com 2, 4, 8, 16 ou raramente 32 células dentro do cenóbio. As células podem ser globosas, elipsóides, piriformes ou lunadas (BICUDO et al., 2006).

Encontrada em praticamente todos os tipos de água doce apresenta grande potencial em processos biotecnológicos, tanto na produção de biomassa quanto na biorremediação de efluentes, pois demonstra excelentes resultados no processo de tratamento das águas residuais, registrando taxas de crescimento semelhantes às relatadas por meio sintético completo (MIYAWAKI, 2014). Tolerar diferentes níveis de temperatura e de pH, tornando-se versátil para a purificação de águas residuais. Para Tang et al. (2011), entre as microalgas, a *Scenedesmus* sp. apresenta diversas características desejáveis na combinação eficiente e econômica da fixação de dióxido de carbono, tratamento de efluentes e síntese de lipídeos para a produção de biocombustíveis.

2.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL

A produção de biomassa de microalgas pode ser realizada em diversos sistemas, com volume variados entre escala laboratorial à escala industrial. A literatura traz registros de práticas realizadas há quase 140 anos, entretanto nos últimos anos houve grandes avanços tecnológicos buscando otimizar a compreensão do potencial biotecnológico destes micro-organismos (LOURENÇO, 2006).

Segundo DERNER et al. (2006), a produção comercial de microalgas no Brasil tem sido realizada principalmente por empresas localizadas no litoral de Santa Catarina e na Região Nordeste do país.

A literatura apresenta sistemas de cultivo em escala industrial que podem ser realizados em lagoas abertas, conhecidos como “raceway ponds”, ou em sistemas fechados, chamados de fotobiorreatores.

As lagoas ou tanques abertos são os mais utilizados na produção comercial de microalgas, devido ao seu baixo custo de construção e operação em relação aos fotobiorreatores. A maior vantagem de utilizar os tanques ou lagoas abertas consiste na simplicidade da sua estrutura, baixo custo e fácil gestão operacional. No entanto, os sistemas abertos apresentam algumas desvantagens, como; evaporação acentuada, variação da temperatura, salinidade, pH, baixa eficiência na absorção de dióxido de carbono e alta taxa de contaminação por micro-organismos.

Devido estas desvantagens, os sistemas abertos apresentam produtividade muito reduzida comparada aos fotobiorreatores.

Os tanques abertos (FIGURA 01), são mantidos sob condições naturais de iluminação e temperatura, sendo o mais adequado para o cultivo de microalgas em sistema fototrófico.

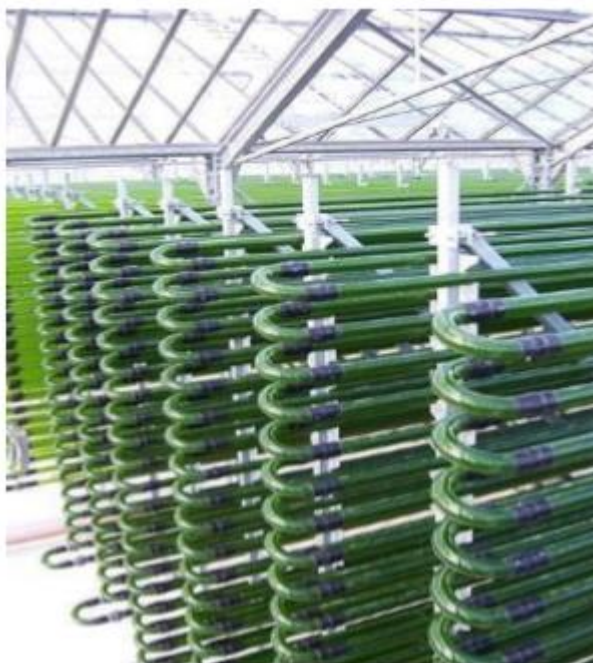
FIGURA 01. TANQUES/LAGOA ABERTAS



FONTE: MUNOZ E GUIEYSSE, 2006.

Os fotobiorreatores (sistemas fechados) (FIGURA 02), permitem controlar as condições de cultivo, podendo ainda manter a cultura sem contaminações, permitem ajustar fatores que potencializam o crescimento e acumulação de produtos de interesse comercial como, pH, concentração de gases, temperatura, nutrientes, porém, possuem por desvantagem o elevado custo de construção, fator limitante na aplicação destes sistemas em plantas comerciais (ERIKSEN, 2008).

FIGURA 02. FOTOBIORREATOR



FONTE: UMWELT BUNDES AMT. 2013.

Assim, a escolha do sistema de cultivo depende do produto final. A indústria farmacêutica ou para obtenção de produtos nobres, requer menor riscos de contaminação e, portanto, devem ser utilizados os sistemas de cultivos fechados, para os demais produtos podem ser aplicados os sistemas de lagoas e tanques abertos sem grandes preocupações.

A tabela 01, compara fatores que devem ser avaliados na escolha do método de cultivo.

TABELA 01. FATORES DE AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE CULTIVO

| Fator | Tanque | Biorreator |
|--------------------------|--|---|
| Espaço necessário | Alto | Baixo |
| Perda de água | Muito alto | Baixo |
| Perda de Co ₂ | Alta dependendo da profundidade da lagoa | Baixo |
| Concentração de Oxigênio | Baixa devido à troca espontânea | Ocorre acúmulo, requer um dispositivo de troca de gás |
| Temperatura | Altamente viável | Resfriamento necessário |
| Limpeza | Nenhum | Necessário, aparecimento de sujeira na parede |
| Contaminação | Alto | Nenhum |
| Evaporação | Alto | Não evapora |
| Qualidade da biomassa | Variável | Reprodutível |
| Custo de colheita | Alto | Baixo |

FONTE: ADAPTADO DE PULZ E GROSS, 2004.

Fotobiorreator de Placas (FIGURA 3), é um sistema fechado que oferece melhores condições de cultivos às microalgas, devido à sua elevada razão superfície/volume (razão S/V). As placas possibilitam sua orientação no sentido de maximizar a captação de luz solar (MOLINA GRIMA et al., 1999). Para grandes produções são dispostas paralelamente sobre uma área, possuem um sistema de transferência de gás, que reduz a necessidade de um aerador.

FIGURA 03. FOTOBIORRETORES DE PLACAS.



FONTE: ADAPTADO DE DASGUPTA ET AL. 2010.

Ainda sendo da mesma categoria os fotobiorreatores de placas se diferem entre si, devido a geometria, aeração, razão S/V, entre outros fatores, conforme apresenta a TABELA 02.

TABELA 02. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO FOTOBIORREATOR DE PLACAS.

| Tipo de fotobiorreator | Razão S/V | Sistema de agitação | Controle de Temperatura | Aeração | Vantagens | Desvantagens |
|--------------------------------------|------------------|--|--------------------------------|----------------|--|---------------------|
| Placa plana com borbulhamento | Média | Borbulhamento pelo fundo ou pela lateral | Serpentina de troca térmica | Borbulhamento | Sistema aberto para o ambiente evita o acúmulo de oxigênio | Cisalhamento |
| Placa tipo-V | Média | Borbulhamento pelo fundo ou pela lateral | Serpentina de troca térmica | Borbulhamento | Alta taxa de mistura, baixo cisalhamento | Preço e montagem |
| Placa plana com movimento de balanço | Alta | Balanço da placa | Serpentina de troca térmica | Borbulhamento | Alta razão S/V | Preço e montagem |

FONTE: ADAPTADO DE DASGUPTA ET AL., 2010.

Atualmente nenhum biorreator atende aos critérios para uma produção barata e eficiente. Oosterhuis e Van den Berg (2011), apresentam biorreatores de sacolas plásticas como alternativa. A área de desenvolvimento de fármacos vem utilizando nos últimos anos reatores plásticos (FIGURA 04), que são menos custosos dos que os de aço ou vidro, por serem flexíveis apresentam fácil manuseio e por serem descartáveis apresentam menor risco de contaminação.

FIGURA 04. FOTOBIORREATORES DE SACOS PLÁSTICOS.



FONTE: ADAPTADO DE KLEIN, 2015.

A produção da biomassa pode ainda, ser conduzida por diferentes formas de condução do processo; batelada, semicontínuo e contínuo (LOURENÇO, 2006).

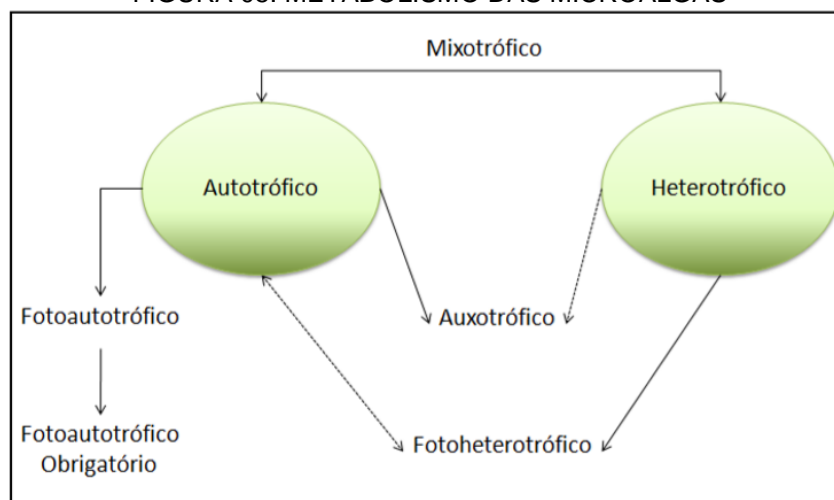
As microalgas são capazes de obter energia a partir de diferentes metabolismos, podendo ser cultivadas em cultura autotrófica, heterotrófica e mixotrófica.

As microalgas autotróficas são capazes de produzir os compostos necessários sem necessitar de uma fonte de carbono orgânico, sintetizando suas moléculas orgânicas a partir de materiais inorgânicos (dióxido de carbono e sais) e energia solar. Ainda que apresente eficiência com a incidência de luz sobre a cultura, neste tipo de cultivo deve-se considerar fatores que podem ocasionar uma redução do crescimento da cultura, pois a densidade celular é uma variável que deve ser analisada, pois quando está em altas concentrações, interferem na incidência da luz, pois limitam a passagem de luz, ou em baixa densidade celular, promove o excesso de luz (fotoinibição).

Outro tipo de cultivo é o heterotrófico, que se difere pelo fato das microalgas utilizarem compostos orgânicos (glicerol, glicose e acetato) como fonte de energia e carbono. Apresenta como vantagem o maior controle do processo de cultivo e o baixo custo na colheita de biomassa.

No cultivo mixotrófico atuam o metabolismo autotrófico e heterotrófico, fazendo com que microalga assimile de forma simultânea o dióxido de carbono e a fonte de carbono fornecida a ela. A FIGURA 05, a seguir demonstra a diferenciação dos cultivos algais.

FIGURA 05. METABOLISMO DAS MICROALGAS



FONTE: DASGUPTA ET AL. 2010.

Algumas microalgas utilizam apenas um tipo de metabolismo, já outras podem alternar entre essas rotas metabólicas, mas tendem a exibir melhor crescimento em um dos modos (RADMER, 1996).

O carbono é o principal constituinte da célula algal. Após a fonte de carbono, o nitrogênio é o elemento mais importante, estando relacionado com a produção de ácidos nucleicos e proteínas. Fósforo é o terceiro elemento mais importante para o crescimento das microalgas, necessitando ser adicionado em excesso, pois nem todos os compostos de fósforo são facilmente assimiláveis pelas células. Além desses elementos, também devem ser adicionados ao cultivo materiais, como Mg, Ca, Mn, Zn, Cu e Mb (KUMAR et al., 2010). A TABELA 03, relaciona os principais nutrientes com a composição elementar presente nas células das microalgas.

TABELA 03. NUTRIENTES NECESSÁRIOS PARA CÉLULAS DE MICROALGAS E A ESTIMATIVA DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE UMA MICROALGA.

| Elemento | Compostos | Unidades de medida/L _{meio} | Intervalo de composição na célula (ug/mg _{massa_seca}) |
|----------|---|--------------------------------------|--|
| C | CO ₂ , HCO ₂ , CO, Moléculas orgânicas | g | 175-650 |
| O | O ₂ , H ₂ O, Moléculas orgânicas | g | 205-330 |
| H | H ₂ O, Moléculas orgânicas | g | 29-100 |
| N | N ₂ , NH ₄ , NO ₃ , NO ₂ , aminoácidos, uréia | g | 10-140 |
| Na | Sais inorgânicos i.e., NaCl, Na ₂ SO ₄ , PO ₄ | g | 0,4-47 |
| K | Sais inorgânicos i.e., KCl, K ₂ SO ₄ , K ₃ PO ₄ | g | 1,0-75 |
| Ca | Sais inorgânicos i.e., CaCO ₃ , Ca | g | 0,0-80 |
| P | Sais inorgânicos, fosfatos de Na ou K | g | 0,5-33 |
| S | Sais inorgânicos, MgSO ₄ .7H ₂ O, aminoácidos | g | 1,5-16 |
| Mg | Sais inorgânicos, CO ₂ , SO ₄ , ou sais de Cl | g | 0,5-75 |
| Fe | FeCl, Fe(NH ₄)SO ₄ , citrato de ferro | mg | 0,2-34 |
| Zn | SO ₄ ou sais de Cl | mg | 0,005-1,0 |
| Mn | SO ₄ ou sais de Cl | mg | 0,02-0,24 |
| Si | Na ₃ SiO ₃ .9H ₂ O | mg | 0-230 |
| B | H ₃ BO ₃ | mg | 0,001-0,25 |

FONTE: KUMAR ET AL. 2010.

Os meios de cultivo devem fornecer os nutrientes necessários para a manutenção e propagação das células. Basicamente existem dois grandes grupos de meios de cultivo: meios sintéticos e meios complexos. Sintéticos são meios cuja composição química é qualitativa e quantitativamente conhecida e os complexos são os que apresentam um composto cuja composição química não é perfeitamente definida.

O carbono, por ser o componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídios, entre outros), é o elemento necessário em maiores concentrações para as algas, seguido pelo nitrogênio que apresenta grande importância para o desenvolvimento da cultura, pois é constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário. As concentrações de proteínas, carotenóides e clorofila nas células tendem a variar em relação a concentração de nitrogênio. A limitação do nitrogênio no meio, reduzem-se as quantidades dessas substâncias, mas em contrapartida sua escassez pode aumentar o conteúdo lipídico (SANTOS et al., 2003). Devido ao fato que a depleção do nitrogênio direciona o metabolismo das microalgas antes voltado à multiplicação celular para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, preparando a célula para um período de privação nutricional (XU et al., 2012).

O fósforo tem importantes funções na célula, participa de todos os processos de trocas energéticas e na constituição de moléculas estruturais. Os principais componentes estruturais que apresentam fósforo em microalgas são ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas, sua assimilação é dependente de luz, possivelmente em razão da acumulação de energia em ATP. Semelhante ao nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes do crescimento celular.

No cultivo, o crescimento desses micro-organismos é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN et al., 2001). Os fatores biológicos estão relacionados as próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento microalgal. Quanto aos fatores físico-químicos, são principalmente reportados estudados sobre a temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e iluminação, entre outros (DERNER et al., 2006).

2.2.1 TEMPERATURA

Trata-se de um parâmetro crítico, pois influencia os processos celulares afetando a capacidade fotossintética, crescimento e respiração das microalgas (ROBARTS e ZOHARY, 1987).

A temperatura ideal para as culturas de microalgas situa-se geralmente entre 25 a 35 °C (COLLIER, 2000), embora a literatura apresenta variações de acordo com a composição do meio de cultura, a espécie ou cepa cultivada. Temperaturas abaixo de 16 °C desaceleram o crescimento, enquanto os superiores a 35 °C são letais para algumas espécies. O efeito da temperatura sobre as reações bioquímicas torna este um dos mais importantes fatores ambientais que influenciam a composição bioquímica das algas. Tem sido relatado que a diminuição da temperatura pode resultar no aumento da produção de enzimas como um mecanismo adaptativo para a manutenção de taxas de fotossíntese e respiração (RICHMOND, 2004).

2.2.2 pH

A maior parte das espécies de microalgas é favorecida por pH neutro, contudo, alguns gêneros conseguem suportar valores até 9,0 e 4,0. O aumento do pH está em função da atividade fotossintética. O pH influencia na eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo através da volatilização da amônia, além da precipitação de ortofosfato. O equilíbrio químico gera uma relação complexa entre pH e disponibilidade de dióxido de carbono dissolvido no meio de cultivo, sendo diretamente relacionado a produtividade de biomassa e manutenção do pH em cultivos autotróficos (KUMAR et al., 2010).

2.2.3 NUTRIENTES

A concentração dos nutrientes é um fator químico, que interfere no crescimento das microalgas. Podem ser classificados como macronutrientes e micronutrientes.

Os nutrientes presentes no meio de cultura podem estimular ou inibir o crescimento de acordo com a quantidade (SHEEHAN et al., 1998). Os principais elementos limitantes do crescimento são o carbono, o nitrogênio e o fósforo (LOURENÇO, 2006).

Para as microalgas heterotróficas a relação carbono-nitrogênio (C/N) também tem um impacto significativo sobre o crescimento de microalgas e biossíntese de lipídios. Normalmente, a razão C/N requerida para o desenvolvimento das microalgas é 20/1 ou 30/1. Entre os minerais essenciais, o ferro desempenha um papel importante na composição bioquímica celular por causa de suas propriedades redox e implicação em processos fundamentais, como a fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de DNA (RICHMOND, 2004).

2.2.4 LUZ

Fundamental no crescimento de microalgas, principalmente para os cultivos autotróficos e fotoautotróficos, pois age como a principal fonte de energia por induzir a atividade enzimática e influenciar a síntese proteica (BERTOLDI et al., 2008). Tanto a quantidade quanto a qualidade da fonte luminosa afetam a taxa de crescimento celular, tendo efeitos diferentes sobre as espécies de microalgas.

A fonte de luz pode ser natural ou artificial. A atividade fotossintética é fortemente influenciada pela radiação, pois progride até determinados valores de irradiação, posteriormente começa a ocorrer inibição do crescimento celular, devido ao fenômeno de fotoinibição (PULZ et al., 2004).

Uma tendência comum de resposta celular para a baixa intensidade da luz é aumentar o conteúdo de clorofila 'a' e outros pigmentos (como a clorofila b, clorofila c, ficobiliproteínas e carotenóides primários). Por outro lado, em resposta a alta intensidade de luz, os carotenóides secundários (por exemplo, zeaxantina, b-caroteno e astaxantina), servem como agentes fotoprotetores.

Altas intensidades de luz tendem a aumentar a produção de polissacarídeo em células algais. Estudos sugerem que o teor de lipídios e ácidos graxos poliinsaturados totais, incluindo ácido eicosapentaenóico, está inversamente relacionada com a intensidade de luz e crescimento celular (RICHMOND, 2004).

2. 3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS

Vantagens potenciais da utilização de algas como matéria-prima para diversos fins na biotecnologia incluem a sua capacidade de: sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídio, elevadas taxas de crescimento, tolerância à regiões que não são adequadas para a agricultura convencional, utilização dos nutrientes para o crescimento, a partir de uma variedade de fontes de águas residuais, proporcionando assim o benefício adicional de biorremediação em águas residuais; remoção do dióxido de carbono de gases emitidos de combustíveis fósseis, contribuem para a redução das emissões de gás de efeito estufa; produção de coprodutos e/ou subprodutos de alto valor agregado, crescimento durante todo o ano com uma produtividade cerca de dez vezes maior que vegetais superiores (HU et al., 2008).

O potencial biotecnológico das microalgas está relacionado às vantagens do cultivo comercial e a obtenção de seus metabólitos, utilizados na alimentação de organismos aquáticos e terrestres, como suplementos alimentares para os seres humanos, ou para seu uso em processos ambientais, como tratamento de águas residuais, fertilização dos solos, biocombustíveis e fitorremediação de resíduos tóxicos (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

2.3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

A busca por compostos bioativos (metabólitos) a partir de microalgas vêm se tornando cada vez mais promissora, acompanhada da introdução crescente de espécies cultivadas a nível comercial, facilitando e viabilizando a obtenção destas moléculas de interesse.

Os organismos fotossintetizantes possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os metabólitos primários respondem ao conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes.

Os metabólitos secundários estão intimamente associados as estratégias de defesa, sendo principalmente distribuídos em três grupos de acordo com sua rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (TAYZ e ZEIGER, 2004).

Os compostos bioativos são geralmente metabólitos secundários, que incluem vários tipos de substâncias que variam entre ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos, peptídeos, vitaminas, substâncias de crescimento, antibióticos e enzimas. A TABELA 04, apresenta as moléculas bioativas, as aplicações e referências de microalgas encontradas na literatura.

A TABELA 04. MOLÉCULAS BIOATIVAS, APLICAÇÃO E REFERÊNCIAS.

| Moléculas bioativas | Aplicações | Referências |
|---|---|--|
| Proteínas | Nutrição humana, nutrição animal, vacinas e benefícios diversos à saúde | Spolaore et al., (2006) Vonshak (1997) Derner et al., (2006) Lourenço (2006) Becker (2004) |
| Lipídeos, triacilgliceróis, ácidos graxos | Nutrição humana, nutrição animal, biodiesel/biocombustíveis | Spolaore et al., (2006) Cohen (1999) Derner et al., (2006) USDOE (2010) Becker (2004) |
| Carotenóides | Pró-vitamínico, anti-câncer, ativação do sistema imune, corante alimentar e cosmético, anti-oxidante, fotoproteção, ação contra doenças degenerativas | Richmaond (2004) Cohen (1999) |
| Hidrocarbonetos | Biocombustíveis | Largeau e Metzger (2001) |
| Polissacarídeos | Agentes gelificantes, espessantes, emulsificantes, biocombustíveis | Cohen (1999) |
| Poli-hidroxialcanoatos | Produção de bioplásticos | Cohen (1999) |
| Ficotoxinas | Atividade citotóxica, anti-câncer/antitumoral, antibióticos, antivirais | Borowitzka (1999) Bakhuni e Rawat (2005) Bonata (2007) |
| Halogenados aromáticos | Antibióticos | Borowitzka (1999) |
| Compostos fenólicos | Antibióticos | Borowitzka (1999) |
| Isótopos estáveis | Estudos metabólicos e de síntese bioquímica | Spolaore et al, (2006) Glazer (1994) |

FONTE: ADAPTADO DE SOUZA. 2016.

2.3.2 APLICAÇÃO FARMACÊUTICA E COSMÉTICOS

O advento da biologia molecular tem levado a uma melhor compreensão da biossíntese e fisiológicas funções das moléculas bioativas em microalgas. Esforços também têm sido investidos para o desenvolvimento de microalgas transgênicas como fábricas celulares verdes para produzir novos fármacos utilizando técnicas de transformação genética (CHU, 2012).

Na década de 70 ocorreram grandes progressos, com a utilização de culturas para a produção de pigmentos, suplementos alimentares e vitaminas para a indústria farmacêutica (SOEDER, 1986). Microalgas são uma fonte potencial de biomateriais utilizados na indústria farmacêutica. Algumas destas; omega-3, ácidos graxos, ácido eicosapentanoico, ácido decosaheptaenoico e clorofila. A clorofila é um outro produto farmacêuticamente importante obtida a partir da microalga. Acredita-se que quase todas as algas cultivadas sob condição ideal contêm em torno de 4% do peso seco de clorofila. Foi relatado que a *Chlorella* possui uma quantidade elevada de clorofila quando comparada com várias espécies de microalgas. A atividade quelante da clorofila tem mostrado benefícios farmacêuticos especialmente no tratamento de úlceras no fígado. Clorofila foi também investigado como fonte de pigmentos em cosméticos (HARUN et al, 2010).

Os metabólitos secundários apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo atividade anticancerígena, antioxidante, antiviral e efeitos imunomoduladores. Há um potencial de descoberta de novos medicamentos a partir destes (CHU, 2012). Ainda, encontramos estudos que demonstram efeito antitumoral, propriedades quimiopreventivas, atividade anti-inflamatória e atividade antimicrobiana (KATHARIOS et al., 2005).

Na aplicação pela indústria de cosméticos, extratos de microalgas podem ser principalmente encontrados em produtos de cuidados para a pele e rosto, como cremes antienvelhecimento, produto regenerador ou refrescante. Outras aplicações cosméticas a partir de microalgas estão representados em produtos para cabelo e proteção solar. Um exemplo de produto comercialmente disponível é um extrato de *Chlorella vulgaris* que estimula a síntese de colágeno na pele, a regeneração de tecidos, contribuindo para a redução do envelhecimento (SPOLOARE et al., 2006).

2.3.3 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Estima-se que, com o consumo atual as reservas mundiais de óleo e gás estarão exauridas dentro de alguns anos. Este fato associado ao aumento do efeito estufa e da temperatura global torna necessário o desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis. A crise energética de 1970 catalisou o início dos estudos relacionados à produção de biocombustíveis microalgais.

As microalgas podem ser utilizadas para a produção de biometano, biodiesel, biohidrogênio e bioetanol. O uso de microalgas para a produção de biocombustíveis é, desta forma, uma alternativa aos combustíveis fósseis.

Fatores como a elevada eficiência de conversão fotossintética, o rápido crescimento, o elevado teor de lipídios e carboidratos, fazem das microalgas uma das matérias-primas mais promissoras para a produção de biodiesel e bioetanol. Segundo Chisti (2007), a produtividade de óleo das microalgas é cerca de 8 a 20 vezes superior à produtividade de óleo das culturas energéticas terrestre.

2.3.4 APLICAÇÃO NA AQUICULTURA

A utilização das algas na aquicultura está diretamente relacionada à sua fundamental importância como fonte de alimento natural para os animais aquáticos. As principais aplicações das microalgas na aquicultura estão associadas com a nutrição, controle da qualidade da água, ou como aditivo alimentar (ex.: coloração característica no salmão e truta) entre outras atividades biológicas (SPOLAORE et al., 2006).

Atualmente, várias espécies de microalgas já foram testadas como fonte de alimento para aquicultura, mas nem todas têm condições de suprir as exigências nutricionais para o desenvolvimento de animais cultivado para o consumo humano. Alguns critérios nutricionais para a seleção da microalga e sua utilização na aquicultura são: ausência de toxicidade, tamanho apropriado para ingestão, apresentar fácil digestibilidade da parede celular e possuírem os componentes bioquímicos essenciais (BROWN et al., 1993). Dependendo do animal e do seu estágio de vida, as microalgas são consumidas diretamente, por várias espécies de herbívoros, que dependem da dieta algal consomem durante

todas as fases de sua vida, ou através do consumo indireto, que ocorre via cadeia alimentar. Na aquicultura são bastante utilizadas para enriquecimento de espécies de zooplâncton na nutrição de peixes. Uma ampla seleção de espécies de microalgas encontra-se disponível para dar suporte às espécies que dependem destas na aquicultura.

2.3.5 APLICAÇÃO ALIMENTÍCIA

O valor nutricional reconhecido da biomassa de algas tem promovido a sua utilização como um suplemento de proteína na nutrição humana. Desde o início da produção comercial de biomassa de microalgas, no início da década de 1950, o desenvolvimento deste produto tem sido focado no mercado nutracêutico e de alimentos funcionais. Há uma tendência crescente deste mercado, bem como o interesse cada vez maior por alimentos naturais. As microalgas com suas vantagens adicionais com uma longa história de utilização alimentar, o cultivo fácil, e alto teor nutritivo tornou-se uma fonte valiosa para estudos imunomoduladores. Os cientistas estão cada vez mais voltando sua atenção para as algas como fábricas de ingredientes, particularmente os componentes nutricionais (RAJA e HEMAISWARYA, 2010). Segundo Richmond (2004), microalgas como *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, assim como *Scenedesmus*, quando corretamente processada têm um sabor atraente e podem ser assim incorporadas em muitos tipos de alimentos humanos, expandindo a demanda destas microalgas no mercado.

2.3.6 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM MICROALGAS

A idéia do uso de microalgas em processos de biorremediação segundo a literatura teve início por volta de 1960, mas ganhou impulso a partir da década de 80 (OSWALD, 1988). Sistemas de micro-organismos são hábeis para eliminar de forma eficiente compostos de nitrogênio e fósforo responsáveis pelos problemas da eutrofização.

Diversos estudos utilizando o cultivo de algas são realizados em áreas como tratamento de águas residuais de processos industriais, destoxificação

biológica e remoção de metais pesados, espécies como *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. são eficientes na remoção e recuperação de metais.

A remoção biológica de nutrientes consiste, na remoção de nutrientes dos efluentes por via biológica. Estes micro-organismos acumulam o nitrogênio e fósforo e os transformam em substâncias de reservas que podem ser convertidas em produtos com valor comercial. Entre as espécies utilizadas para a remoção do excesso de nutrientes de efluentes, têm-se as clorofíceas e algumas cianobactérias (BOROWITZKA, 1999).

Cultivos em grande escala de algas podem contribuir de forma significativa na redução da eutrofização resultante da ação antrópica. No final do século passado, os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* foram utilizados com êxito em estudos que visam à remoção de nutrientes (TWIST et al., 1998).

2.4 EFLUENTE DE ABATEDOURO AVÍCOLA

De maneira geral, os efluentes de abatedouros de aves são compostos de material proteico, gorduras, penas, areia, fezes e ossos. Do ponto de geração até a entrada da Estação de Tratamento de Efluentes, a qualidade do efluente é determinada pela eficiência na segregação do sangue, vísceras, penas e ossos.

Os abatedouros de aves se caracterizam pela alta geração de efluentes com elevada carga orgânica que varia de 1.000 a 3.700 mg L⁻¹ (GIORDANO, 2004). A média de água utilizada por cabeça de frango é de 25 a 50 litros (LUCYK et al., 2015) e cerca de 60 a 70% da água que é utilizada em frigoríficos entra em contato com produtos cárneos.

Para as indústrias de abate de aves, os parâmetros mais importantes são a carga orgânica, pH, temperatura, materiais sedimentáveis, óleos e graxas, nitrogênio total e fósforo total. Dentre estes, os parâmetros que requerem maior atenção são a carga orgânica, nitrogênio e fósforo, devido à alta carga proteica e lipídica do efluente (SCHATZMANN, 2009).

2.4.1 PROCESSOS DE TRATAMENTO

Os sistemas de tratamento de efluentes de indústrias da carne incluem a maioria dos procedimentos de tratamento de resíduos existentes. Estes sistemas podem ir desde a simples sedimentação (eliminação dos sólidos por gravidade) a tratamentos mais complexos com sistemas físicos, químicos e biológicos operando de maneira combinada (OCKERMAN, et al., 1994).

Os efluentes gerados nas indústrias de abate de aves podem ser segregados em duas principais linhas, com características específicas (OLIVO, 2006):

- LINHA VERMELHA: Efluentes originados no processo industrial propriamente dito, com conteúdo proteico e gorduroso (Penas, Vísceras, Ossos e Sangue);
- LINHA VERDE: Demais efluentes contendo areia, excrementos, argila, maravalha, etc. (Linha Recepção, hidrossanitário, lavanderia, refeitório, purga de caldeiras, compressores e torres evaporativas).

Existem inúmeros processos para o tratamento de efluente líquidos, que variam de acordo com as características de efluente bruto gerado no processo que varia de acordo com a matéria prima e com a planta processadora.

Em geral as agroindústrias utilizam processos tradicionais que combinam o tratamento físico-químico ao tratamento biológico. A fim de atender as exigências determinadas pela legislação vigente.

A utilização do cultivo das microalgas como tratamento auxiliar das águas residuárias proveniente das indústrias de abate de aves, pode apresentar algumas vantagens como a capacidade de assimilar elementos como o nitrogênio e o fósforo, visto que estes nutrientes caracterizam um gargalo na eficiência dos tratamentos comumente aplicados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O experimento e ensaios foram realizados na Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Bloco Didático IV, no laboratório de Tecnologia de Bioprodutos, sob a orientação do Professor pesquisador Luis Fernando Souza Gomes.

3.2 CEPA UTILIZADA *Scenedesmus subspicatus*.

O isolado da microalga foi obtido do Laboratório de Ficologia da UNIOESTE- Universidade Estadual do Oeste do Paraná- Campus de Toledo e mantido sob refrigeração, em condições adequadas até o momento da utilização.

3.3 LOCAL DE CULTIVO

Para realizar o experimento o local foi adaptado e isolado na parte interna do laboratório, instalados os equipamentos, visando a segurança do local, no que diz respeito a eletricidade, aquecimento e uniformização da iluminação, como pode ser visto na FIGURA 06.

FIGURA 06. LOCAL DE CULTIVO.



FONTE: A AUTORA

3.4 MEIO ALTERNATIVO

O efluente utilizado nos ensaios, foi proveniente de um abatedouro de aves da região Oeste do Paraná, sendo este coletado após o tratamento preliminar físico-químico, composto por um flotador. O efluente foi conduzido ao Laboratório de Bioprodutos da UFPR – Setor Palotina, sendo armazenado em garrafas plásticas, uma amostra foi separada para sua caracterização.

3.4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE

As análises de nitrito, nitrato e ortofosfato, foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Água e Limnologia, sob laudo nº 20181038, ambos situados nas dependências da Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina.

O potencial hidrogeniônico foi determinado através de um medidor de pH digital modelo Luca 210, Versão 8.0, Lucadema, sendo calibrado conforme instruções do fabricante antes das medições. As medições efetuadas através da imersão direta do eletrodo nos recipientes de cultivo visando especificar o índice de acidez da amostra.

3.5 MEIOS DE CULTIVO

3.5.1 Meio de Cultivo Padrão

O meio de cultivo M.C. foi escolhido como padrão para uso neste experimento, para a comparação com o meio alternativo proposto que foi a água residuária proveniente de uma indústria de abate de aves, pela simplicidade e praticidade do seu preparo e ainda por ser amplamente utilizado e indicado em cultivos de microalgas por outros pesquisadores em diversos trabalhos.

3.5.1.1 Composição do Meio M.C.

O meio de cultivo foi preparado com o auxílio de uma balança digital de precisão onde foram pesados os nutrientes conforme as quantidades descritas na TABELA 05.

TABELA 05. COMPOSIÇÃO DO MEIO M.C

| Substâncias | Quantidade |
|--|------------|
| Nitrato de potássio (KNO ₃) | 1,250 g |
| Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) | 1,250 g |
| Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ . 7H ₂ O) | 1,250 g |
| Sulfato de ferro II heptahidratado (FeSO ₄ . 7H ₂ O) | 0,020 g |
| Ureia ((NH ₂) ₂ CO) | 1,000 g |
| Água destilada | 1000 mL |
| Solução 5 | 1 mL |

Substâncias para Solução 5

| | |
|--|---------|
| Ácido bórico (H ₃ BO ₃) | 2,900 g |
| Cloreto de manganês tetra hidratado (MnCl ₂ . 4H ₂ O) | 1,810 g |
| Cloreto de zinco (ZnCl ₂) | 0,110 g |
| Sulfato de cobre Pentahidratado (CuSO ₄) | 0,08 g |
| Molibdato de amônio tetra hidratado (3(NH) ₄ MoO ₃ .4H ₂ O) | 0,018 g |
| Água destilada | 1000 mL |

 FONTE: A AUTORA.

3.6 PREPARO DO CULTIVO

O cultivo inicial foi realizado sem fotoperíodo, sob uma iluminância de 2.000 lux em ambiente isolado, visando minimizar a possível ocorrência de desuniformidades no experimento. Os recipientes e utensílios utilizados foram mantidos em condições ideais até o momento da utilização no experimento.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular das microalgas foi determinada por contagem utilizando-se um microscópio óptico e o auxílio de Hemocitômetro de Neubauer espelhado, no qual são contados os quatro quadrados maiores dos cantos da câmara e o quadrado maior da parte central, que depois de somados são divididos por cinco e multiplicado por vinte e cinco, número total de quadrados maiores da câmara, resultando um número x. Como a câmara do hemocitômetro de Neubauer possui 400 quadrados menores, cada um com uma área de 0,0025 mm² e profundidade de 0,1 mm, o resultado da concentração celular será expresso em valores na ordem de grandeza de X.10⁴ células mL⁻¹.

3.8 CULTIVO INICIAL

Inicialmente para os tratamentos foram utilizados 20 *erlenmeyers* de 500 mL, com 5 tratamentos distintos em quadruplicata, com preenchimento de 50 mL de cultivo total por frasco, sendo 2 concentrações de meio Alternativo, com 100% e 50% de água residuária autoclavada, e as mesmas concentrações sem autoclavar, diluídas em água destilada, e o meio M.C. a 100% como citado na literatura, visando obter as velocidades individuais de crescimento e identificação do melhor crescimento celular específico. Todos os tratamentos foram efetuados sob iluminação de 2000 lux, fotoperíodo integral, sem aeração e sem agitação mecânica, sendo somente agitadas manualmente a cada 24 horas, a fim de evitar a deposição ou sedimentação celular e permitir a retirada de amostras diárias para a contagem de quantificação celular para composição de curva de crescimento. Os tratamentos foram inoculados de maneira igualitária com parte do líquido obtido da cultura inicial de ativação, respeitando uma concentração inicial de $1,36.10^4$ Células mL⁻¹, da alga *Scenedesmus subspicatus* e conduzidos de forma a atingir o ponto de maior crescimento celular bem como parte da fase de declínio ou morte celular. Todos os tratamentos foram contados diariamente para a obtenção dos dados.

3.9 CULTIVO DEFINITIVO

Para o cultivo definitivo utilizaram-se recipientes com capacidade de 2 litros, de material pet incolor, com alta transparência visando à passagem da luz oferecida pelo sistema de iluminação, sendo que a quantidade de meio utilizado foi de 1,5 litros, seguindo os tratamentos aplicados nos 20 ensaios iniciais, porém com aeração a fim de promover uma melhor homogeneização do meio. Os tratamentos foram distribuídos e inoculados de maneira a atenderem à concentração do cultivo inicial $1,36.10^4$ células mL⁻¹, conduzidos e remanejados diariamente dentro do local de cultivo, a fim de minimizar possíveis diferenças no ambiente utilizado.

3.11 PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA

O material obtido nos cultivos foi submetido à centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos, em centrífuga de bancada NI1812, NOVA Instruments, para separação da biomassa, a qual posteriormente foi seca em estufa a 85° C, até que a massa permanecesse constante. Sendo a produtividade obtida pela relação entre a biomassa seca e o volume de cultivo num determinado intervalo de tempo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEIO ALTERNATIVO

A composição inicial do meio alternativo pode ser vista pela TABELA 06, onde são apresentados as concentrações de nitrito, nitrato e ortofosfato presentes no efluente avícola antes da realização dos experimentos.

TABELA 06. COMPOSIÇÃO INICIAL DO EFLUENTE AVÍCOLA.

| Amostras | Nitrito (mg L ⁻¹) | Nitrato (mg L ⁻¹) | Ortofosfato (mg L ⁻¹) |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 0,0272 | 0,9179 | 0,0680 |
| 1 | 0,0238 | 1,5599 | 0,0820 |
| 1 | 0,0238 | 0,6466 | 0,0860 |
| (Média da Triplicata) | 0,0249 | 1,0410 | 0,0786 |

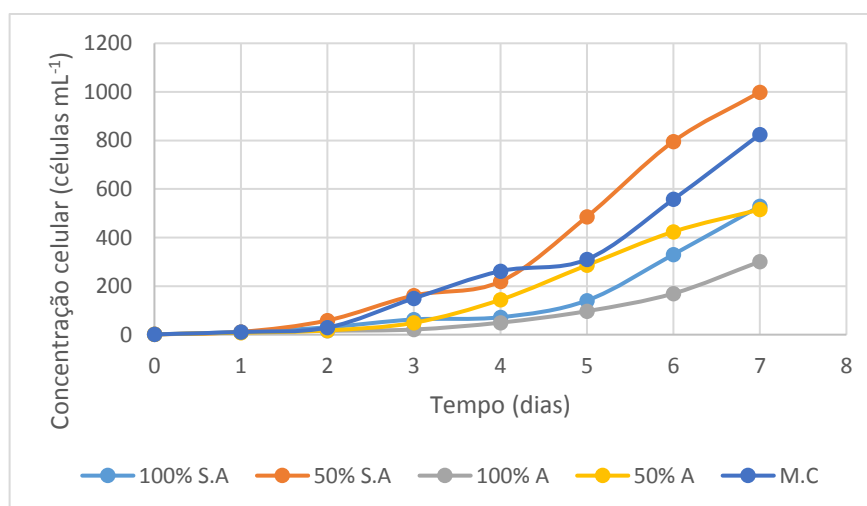
FONTE: LAUDO Nº 20181038. LABORATÓRIO DE QUALIDADE DE ÁGUA E LIMNOLOGIA.

O valor de pH encontrado foi de 7,24 do meio alternativo. Valor ideal para o crescimento e desenvolvimento de microalgas de diversas espécies, assim o mesmo não necessitou ser corrigido ou ajustado para a execução dos tratamentos propostos.

4.2 CRESCIMENTO CELULAR

A concentração celular da biomassa está representada pelo GRÁFICO 01, apresentando este a média da concentração celular obtida pelas 4 réplicas de cada tratamento pelo tempo (dia).

GRÁFICO 01. CRESCIMENTO CELULAR



FONTE: A AUTORA

Como pode ser visto o inóculo apresentou as fases características de crescimento, onde, durante as 48 horas iniciais o mesmo manteve-se constante, sob adaptação e a partir disso apresentou a fase de crescimento exponencial.

4.3 VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO

A velocidade de crescimento foi determinada através da Equação 1;

$$\ln(X/X_0) = v \cdot t \quad (\text{equação 1})$$

Onde, **X** representa a Concentração celular final; **X₀** a Concentração celular inicial; **v** representa a velocidade de crescimento e **t** o tempo.

Através dos dados obtidos, utilizou-se a análise de variância para fins de identificar linearidade nos resultados do cultivo, que podem ser observados pela TABELA 07.

TABELA 07. ANÁLISE DE VARIÂNCIA SOBRE A VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO

| Anova | | | | | |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------------|--------------|
| CV | GL | SQ | QM | F calc | F tab |
| TRATAMENTO | 4 | 0,2308 | 0,057707 | 169,33* | 2,9 |
| RESÍDUO | 15 | 0,0051 | 0,000341 | | |
| TOTAL | 19 | 0,2359 | | | |

* significativo pelo teste F a 5% de significância.

TABELA 08. VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO APRESENTADO POR DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO: EFLUENTE 100% S.A (EFLUENTE 100%, SEM AUTOCLAVAR), 50% S.A (EFLUENTE DILUÍDO EM 50%, SEM AUTOCLAVAR), 100% A (EFLUENTE 100%, AUTOCLAVADO), EFLUENTE 50% A (EFLUENTE DILUÍDO EM 50%, AUTOCLAVADO) E O MEIO M.C

| Tratamento | Produtividade de biomassa (g L⁻¹ semana⁻¹) |
|-------------------|---|
| 50% A | 0,6968 ^a |
| 100%SA | 0,6773 ^a |
| 50%SA | 0,4907 ^b |
| 100%A | 0,4821 ^b |
| MC | 0,4027 ^c |

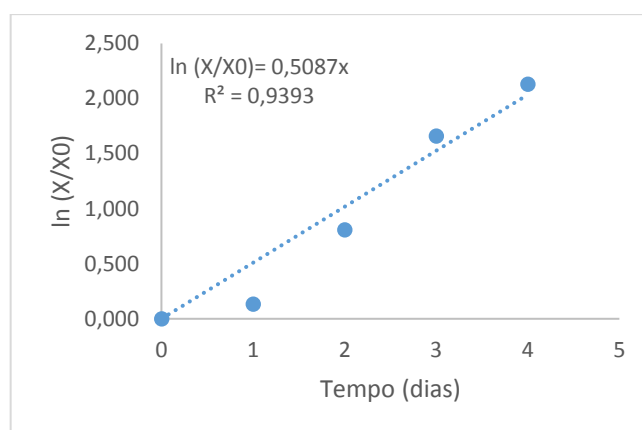
Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

FONTE: A AUTORA

Analisando a TABELA 07 e 08, podemos dizer que os tratamentos 50%A e 100% S.A foram melhores que 50%S.A e 100% A, e, ainda, que todos foram superiores ao meio MC.

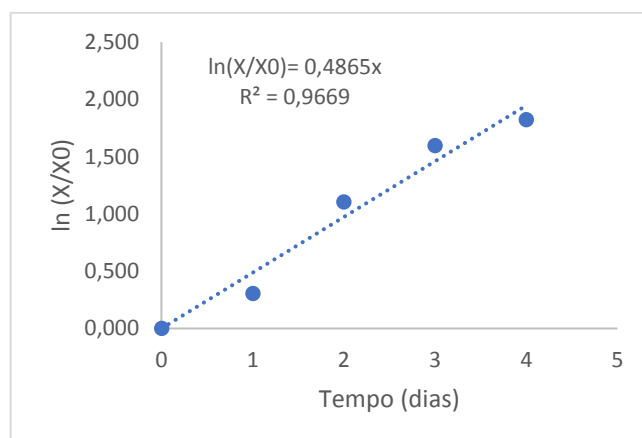
A seguir podemos observar o GRÁFICO 02, onde está representada a velocidade específica do tratamento 100% S.A, o GRÁFICO 03, representando a velocidade específica do tratamento 50% S.A, o GRÁFICO 04, apresenta a velocidade específica do tratamento 100% A, o GRÁFICO 05, demonstra os dados do tratamento 50% A e o GRÁFICO 06, apresentando os dados obtidos pelo meio M.C.

GRÁFICO 02. VELOCIDADE ESPECÍFICA PELO TEMPO PARA O TRATAMENTO 100% S.A



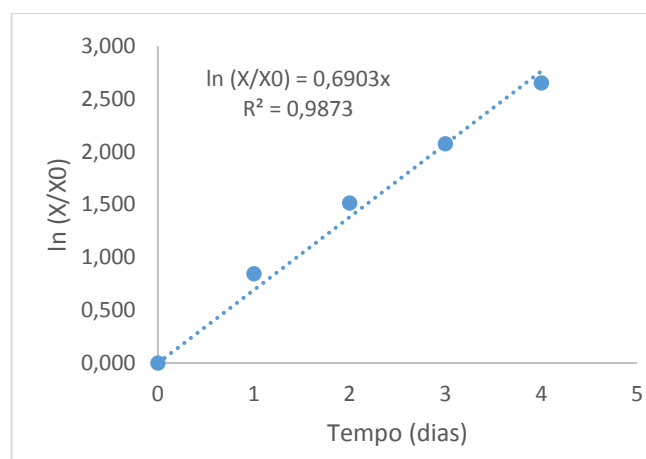
FONTE: A AUTORA

GRÁFICO 03. VELOCIDADE ESPECÍFICA PELO TEMPO PARA O TRATAMENTO 50% S.A



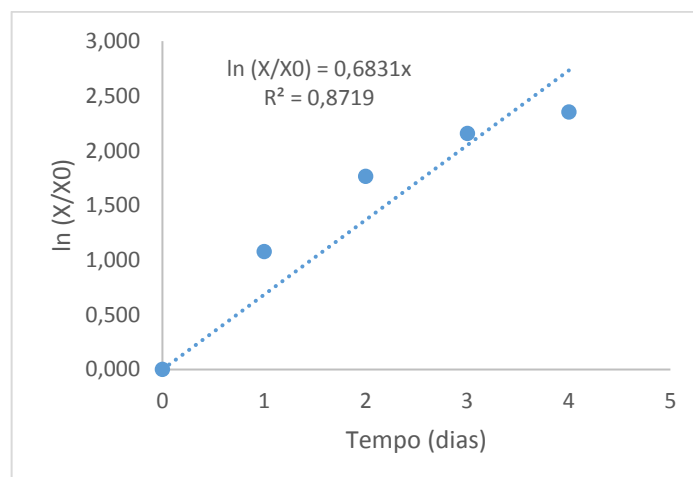
FONTE: A AUTORA

GRÁFICO 04. VELOCIDADE ESPECÍFICA PELO TEMPO PARA O TRATAMENTO
100% A



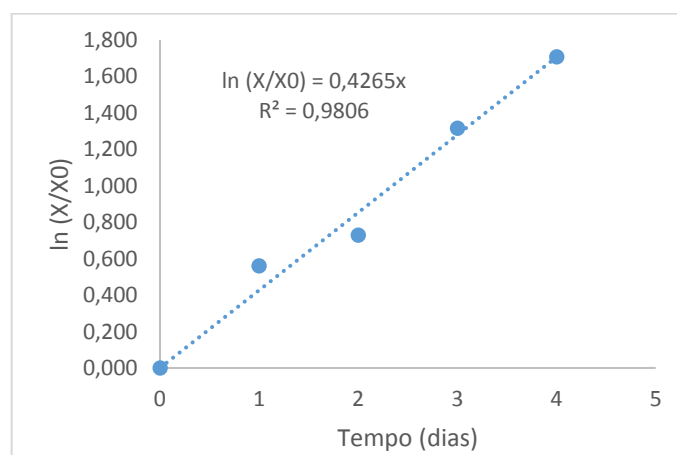
FONTE: A AUTORA

GRÁFICO 05. VELOCIDADE ESPECÍFICA PELO TEMPO PARA O TRATAMENTO
50% A



FONTE: A AUTORA

GRÁFICO 06. VELOCIDADE ESPECÍFICA PELO TEMPO PARA O MEIO M.C



FONTE: A AUTORA

4.4 PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA

A produtividade de biomassa foi avaliada nos 5 tratamentos utilizados e apresentados pela TABELA 09, a produção de biomassa foi representada pela média das 4 réplicas sobre o tempo de cultivo (07 dias).

TABELA 09. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DA MICROALGA *Scenedesmus subspicatus*.

Anova

| CV | GL | SQ | QM | F calc | F tab |
|------------|----|--------|----------|---------------|-------|
| TRATAMENTO | 4 | 0,3067 | 0,076668 | 11,95* | 2,9 |
| RESÍDUO | 15 | 0,0962 | 0,006415 | | |
| TOTAL | 19 | 0,4029 | | | |

* significativo pelo teste F a 5% de significância.

FONTE: A AUTORA

TABELA 10. PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DA MICROALGA *Scenedesmus subspicatus* CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO: EFLUENTE 100% S.A (EFLUENTE 100%, SEM AUTOCLAVAR), 50% S.A (EFLUENTE DILUÍDO EM 50%, SEM AUTOCLAVAR), 100% A (EFLUENTE 100%, AUTOCLAVADO), EFLUENTE 50% A (EFLUENTE DILUÍDO EM 50%, AUTOCLAVADO) E O MEIO M.C.

| Tratamento | Produtividade de biomassa |
|------------|---|
| | (g L ⁻¹ semana ⁻¹) |
| 50% A | 0,965 ^a |
| 100%SA | 0,855 ^{ab} |
| 50%SA | 0,7525 ^{bc} |
| 100%A | 0,7275 ^{bc} |
| MC | 0,5975 ^c |

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como podemos observar na TABELA 09 e 10, a produção de biomassa no tratamento 50%A foi superior ao meio M.C., e os tratamentos 100%S.A, 50%SA e 100%A apresentaram o mesmo rendimento do meio M.C.

Com os resultados obtidos pelo teste de Tukey podemos observar que além dos resultados de produção de biomassa terem sido satisfatórios, pois foram superiores ou iguais ao rendimento obtido pelo meio M.C, o efluente avícola pode ser utilizado sem a necessidade de esterilização ou diluição, características que viabilizam a implantação dos tratamentos em maiores escalas.

A literatura apresenta cultivos dessa mesma espécie de alga em vinhaça como meio alternativo, onde, Ramirez (2013), conduziu tais tratamento com diferentes concentrações do efluente. Os tratamentos foram realizados com

concentrações de 12,5 a 50% de vinhaça e a maior produtividade obtida foi de 0,4640 g L⁻¹ de biomassa.

Oliveira (2013) utilizou efluente de bovinocultura biodigerido como meio alternativo para o cultivo de *Scenedesmus* sp. obtendo 0,78 g L⁻¹ de biomassa no cultivo com 20% do meio alternativo, no 9º dia de cultivo.

Torres, et al. (2014), testaram efluente de tratamento de esgoto sanitário como meio alternativo para obtenção de biomassas para a produção de biocombustíveis, dentre as espécies testadas encontra-se a *Scenedesmus* sp. que ao 10º dia de cultivo apresentou uma concentração de 31,4 g L⁻¹.

Fritsch (2017), avaliou o crescimento de microalgas em águas tratadas de mineração de carvão, onde a microalga *Scenedesmus* sp. apresentou ao final do experimento 0,5 g L⁻¹ de biomassa.

Rolim, et al (2016), cultivaram microalgas como agentes para biorremediação e produção de lipídios em efluente de curtume, e o tratamento foi realizado com duas espécies de microalgas que apresentaram produtividade de biomassa 1,162 g L⁻¹ para *Scenedesmus* sp. e 1,312 g L⁻¹ para a *Chlorella* sp. Os mesmos autores em 2017, testaram o cultivo de *Scenedesmus* sp. em efluente de curtume a fim de utilizar a biomassa para a produção de biodiesel, onde, realizaram os cultivos em concentrações de 25, 50 e 100% do efluente, e o maior concentração de biomassa obteve-se no cultivo com 100% do efluente que apresentou 1,75 g L⁻¹.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de águas residuais e efluentes agroindustriais têm se demonstrado uma ótima alternativa para a utilização como meio alternativo, no cultivo para obtenção de biomassa.

Os ensaios realizados demonstraram resultados superiores quando comparados ao meio padrão (meio M.C). Ainda que realizado em pequena escala os ensaios possibilitaram demonstrar que o efluente de abatedouro avícola é um meio alternativo potencial na produção de biomassa, podendo ser utilizado tanto puro ou em diluições de 50% sem que sua produtividade seja estatisticamente, nos parâmetros utilizados por este trabalho, significativos.

Para a velocidade específica de crescimento, os tratamentos 50%A e 100% S.A foram melhores que 50%S.A e 100% A, e, todos foram superiores ao meio MC.

Neste trabalho o melhor tratamento para obtenção de biomassa algal foi o 50% A, com rendimento de $0,965 \text{ g L}^{-1}$, no sétimo dia de cultivo.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se a avaliação de mais parâmetros durante o cultivo da microalga, a fim de otimizar a produção de biomassa e manipular a produção de metabólitos de interesse, bem como avaliar taxas de remoção de nutrientes remanescentes no efluente, ou meio de cultivo utilizado.

Caracterizar a biomassa obtida, para fins de aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- BARROS, F. G., et al. **Modificação da população microbiana de uma lagoa facultativa tratando efluente líquido de abatedouro de frango**. XXVII Congresso Interamericano de engenharia Sanitária e Ambiental. 2014.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **B. CEPPA**, v. 26, p. 9-20, 2008.
- BICUDO, C. E. M; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil, chave para identificação e descrições**. Rima. 2 ed. São Carlos. 2006.
- BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. n.70, p.313-321, 1999.
- BRACHER, E. H. et al., **Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella minutíssima* e *Spirulina* sp. Leb 18 utilizando soro de leite como fonte de carbono**. V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina. 2015.
- BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. **Aquatic biomass and carbon dioxide trapping**. Energy Conversion and Management, 34, 1005-13, 1993.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 7, p. 565-566, 2004.
- CHU W-L. Biotechnological applications of microalgae. **leJSME**. v. 6 (Suppl 1). p. S24-S37, 2012
- CHU, F. L.; PIRASTRU, L.; POPOVIC, R. et al Carotenogenesis Up-regulation in *Scenedesmus* sp. Using a Targeted Metabolomics Approach by Liquid Chromatography- High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 59, p. 3004– 3013, 2011.
- COLLIER, J. L. Flow cytometry and the single cell in phycology. **J phycol**, v.36, p. 628-44. 2000.
- COSTA, J. C. **Uso de coagulante orgânico tanino no tratamento de efluente de abatedouro avícola**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Paraná. Palotina. 2016.
- DAMASCENO, S. et al. Caracterização e readequação de sistema de tratamento de efluentes de frigorífico de aves. **I Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos de Animais**. Florianópolis. 2009.

DANTAS, D. M. M. **Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2013.

DASGUPTA, C. N. et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10218-10238, 2010.

DERNER, R. B. et al. **Microalgas, produtos e aplicações.** Ciência Rural, v. 36, n.6, p.1959-1967. Santa Maria. 2006.

DINIS, M. A.; MONTEIRO, A.; BOAVENTURA, R. Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. Edições Universidade Fernando Pessoa: **Revista da faculdade de ciência e tecnologia**. Porto. Issn 1646-0499. 1, p. 41-54. 2004.

DUARTE, S. I. S. **Estudo da produção de microalgas a partir de águas residuais.** Dissertação de mestrado. Instituto Politécnico de Tomar.

ERIKSEN, N.T. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9), p:1525-1536, 2008.

FRITSCH, S. L. Crescimento de microalgas em águas tratadas da mineração de carvão. **XXIX Salão de Iniciação Científica.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Campus do Vale. 2017.

GIORDANO, G. **Tratamento e controle de efluentes industriais.** Prof. Adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente – UERJ. Diretor Técnico da TecmaTecnologia em Meio Ambiente Ltda. 2004.

HARUN, R; SINGH, M.; FORDE, G. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037–1047, 2010.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008

KATHARIOS, P.; PAPADAKIS, I.E.; PRAPAS, A. et al. Mortality control of viral encephalopathy and retinopathy in 0+ grouper *Epinephelus marginatus* after prolonged bath in dense *Chlorella minutissima* culture. **Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.** v. 25, p. 28–31, 2005.

KLEIN, A. P. Avaliação de diferentes fotobiorreatores para cultivo de microalgas. 2015.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; VAN LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371-80, 2010.

LACERDA, L. M. C. F. **Otimização de sistemas de microalgas para mitigação de CO₂ e produção de Biodiesel**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2013.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. ISBN 8576561131.

LUCYK, N. et al. Uso de coagulantes naturais no tratamento de coagulação/floculação de efluente proveniente de abatedouro de aves. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**. Florianópolis, n. esp, p.576-587. 2015.

MAGRO, F. G. et al. PRODUÇÃO DE BIOETANOL UTILIZANDO MICROALGAS: UMA REVISÃO. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. Londrina, v.37, n. 1, p.159-174. 2016.

MATA, T. M. et al. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v.107. p. 151-158, 2012.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MIYAWAKI, B. **Purificação de biogás através de cultivo de microalgas em resíduos agroindustriais**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2014.

MOLINA GRIMA, E. et al. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v.70, n.1 p.131-247, 1999.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. **Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review**. Water Research, v.40, p.2799-2815, 2006.

NUNES, José Alves. **Tratamento Físico-Químico de Águas Residuárias Industriais**. 4a. Aracaju: J. Andrade, 2004. p. 298. CDU 628.54.

OCKERMAN, Herbert W. and HANSEN, Conly L. **Industrialización de subproductos de origen animal**. Zaragoza: ACRIBIA, 1994. p. 377.

OLIVEIRA, A. C. **Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2013.

OLIVO, Robinson. **O Mundo do Frango, Cadeia Produtiva da Carne do Frango**. Criciúma: Editora do Autor, 2006. 680p

OOSTERHUIS, N. M. G.; VAN DEN BERG, H. J. **How multipurpose is a disposable bioreactor?** **BioPharm International**, 2011.

ORTENZIO, Y. T. et al. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis; perspectivas e desafios. **Bioenergia em revista: diálogos**, n.1, p.58-65. 2015.

OSWALD, W.J. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. **Micro-algal Biotechnology**. 2. ed., Sydney, 477 pp., 1988.

PASTORE, A. **Produção de algas *Scenedesmus subspicatus* utilizando água residuária de piscicultura como meio alternativo**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Paraná. Palotina. 2013.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnololgy of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 65, p. 635 – 648, 2004.

RADMER, R. J. Algal diversity and commercial algal products. **American Institute of Biological Sciences**, v. 46, p. 263-270, 1996.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S. Microalgae and Immune Potential. In: WATSON R. R., ZIBADI S., PREEDY V. R. **Dietary Components and Immune Function**. Humana Press: London, 2010, p. 515-527.

RAMIREZ, N. N. V. **Estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em vinhaça**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2013.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 6a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. 2001, 906 p.

RAVEN. J. A. **Micro-algal biotechnology: Limits to growth**. Cambridge: Cambridge University, 1988.

RICHMOND, A. Handbook of microalgae culture: Biotechnology and applied phycology. **Analytical biotechnology**, v. 296, n.2, 2004.

ROBARTS, R. D.; ZOHARY, T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 21, p. 391-399, 1987.

ROLIM, G; GUTTERRES, M. **Cultivo de microalgas em efluente de curtume visando a biorreeadiação e produção de lipídios**. Laboratório de estudos em couro e meio ambiente (LACOURO). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.

ROLIM, G; GUTTERRES, M. **Cultivo de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de curtume: utilização da biomassa para produção de biodiesel e aproveitamento como bioissorvente**. Laboratório de estudos em couro e meio ambiente (LACOURO). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2017.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influencia do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23(Supl), p. 17 – 21, dez. 2003.

SCHATZMANN, H. C. **Tratamento avançado de efluente de frigorífico de aves e o reuso da água**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2009.

SCHMITZ, R. et al. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC – UPF**, v.4 (1), p.p 48-60. 2012.

SHEEHAN, J.; DUNAH, Y. T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - **Biodiesel from Algae**. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development. National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-58024190, 1998.

SILVA, A. N. et al. Desenvolvimento de sistema fotobiorreator de microalgas para sequestro de CO₂. **Revista de engenharia e pesquisa aplicada**, v. 2, n. 1. P. 342-345. 2016.

SOEDER C. J., HEGEWALD E. *Scenedesmus*. In: BOROWITZKA M. A., BOROWITZKA L. J. **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge University Press: Cambridge, 1988, p.59-84

SOEDER, C. **A historical outline of applied phycology**. **Handbook of Microalgal Mass Culture**, CRC Press: Florida, 1986, pp. 25-41.

SOUZA, L. S. **Caracterização morfofisiológica, produção de lipídeos e carotenóides em diferentes condições de cultivo de duas microalgas com potencial biotecnológico**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2016.

SPOLAORE, P. et al. A. Commercial applications of microalgae: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S.; SIMPSON, C. G. Removal of Copper and Immobilized Microalga, *Chlorella Vulgaris*. In: Wong, Y. S. e Tam, N.F.Y. **Wastewater Treatment with Algae**. Springer-Verlag, v. 2, p. 17-36. 1998.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. **CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels**. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 3071-3076, 2011.

TAYZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

TORRES, H. S. J; CASSINI, S. T. A; GONÇALVES, R. F. Isolamento, sobrevivência e caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de

biocombustíveis. **IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**. Porto Alegre – RS. 2014.

TWIST, H.; EDWARDS, A. C.; COD, G. A. Algal Growth responses to waters of Contrasting Tributaries of the River Dee, North-East Scotland. In: **Water Research**, v. 32, p.2471-2479. 1998.

UMWELT BUNDES AMT. **Wasser, Trinkwasser und Gewässerschutz – Schutz der Meere**. Disponível em: <<http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/meere/mikroalgen.htm>>. Acesso em: 13/5/2018.

VENDRUSCOLO, J. B. G. **Cultivo da microalga *Scenedesmus quadriculada* em efluentes de biodigestão de aves e suínos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Goiás. Goiânia. 2009.

WATANABE, A. 1960. List of algal strains in collection at the institute of applied microbiology, University of Tokyo. J. **Gen. Appl. Microbiol.**, 6(4): 283-292.

XU, L. et al. Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor. **Eng. Life Sci.**, v. 12, n. 2, p.171 – 177, 2012.